

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КО-ТРИМОКСАЗОЛА НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА МЫШЕЙ, ВЫЗВАННОГО МИКОБАКТЕРИЯМИ ТУБЕРКУЛЕЗА С ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ

С. А. ПОПОВ¹, Г. Н. МОЖОКИНА¹, С. А. КОСЕНКОВ¹, Н. А. ЕЛИСТРАТОВА¹, Т. П. САБГАЙДА^{1,2}

¹НИИ фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» МЗ РФ, Москва, Россия

²ФГБУ «Центральный НИИ организации и информатизации здравоохранения» МЗ РФ, Москва, Россия

Изучена эффективность применения ко-тримоксазола при лечении мышей, зараженных микобактериями туберкулеза (МБТ) с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) и предполагаемой чувствительностью к ко-тримоксазолу.

На 78 клинических культурах МБТ показано, что лекарственная устойчивость МБТ к препаратам 1-го ряда (случаи с множественной лекарственной устойчивостью – МЛУ) может сопровождаться расширением полиморфизма по признаку лекарственной восприимчивости к ко-тримоксазолу, что дает возможность применять этот препарат в качестве аддитивного для лечения больных с МЛУ/ШЛУ возбудителя. Использование ко-тримоксазола в качестве аддитивного препарата к изониазиду на модели генерализованного туберкулеза у мышей с заражением штаммом МБТ генетического семейства *Beijing* с ШЛУ снижало бактериальную нагрузку легких до 10 раз.

Детальная оценка лекарственной восприимчивости/устойчивости МБТ к аддитивному препарату ко-тримоксазол, а также изучение взаимного влияния этого препарата с набором лекарственных средств, обеспечивающих IV и V режимы лечения, могут служить основой совершенствования режимов лечения больных с МЛУ/ШЛУ возбудителя с уточнением дозировок и кратности приема в каждом конкретном случае.

Ключевые слова: экспериментальный туберкулез у мышей, туберкулез с МЛУ/ШЛУ возбудителя, лекарственная чувствительность *M. tuberculosis* к ко-тримоксазолу

INVESTIGATION OF CO-TRIMOXAZOLE EFFICIENCY USING THE EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS MODEL IN MICE CAUSED BY TUBERCULOUS MYCOBACTERIA WITH EXTENSIVE DRUG RESISTANCE

S. A. POPOV¹, G. N. MOZHOKINA¹, S. A. KOSENKOV¹, N. A. ELISTRATOVA¹, T. P. SABGAYDA^{1,2}

¹Research Institute of Phthisiopulmonology of I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Central Research Institute for Public Health Organization and Informatization, Moscow, Russia

The efficiency of using co-trimoxazole for treatment of mice infected with tuberculous mycobacteria with extensive drug resistance and supposed sensitivity to co-trimoxazole have been investigated.

The study of 78 clinical cultures of tuberculous mycobacteria has demonstrated that drug resistance to first line drugs (cases with multiple drug resistance – MDR) can be accompanied by the expansion of polymorphism in the part of drug susceptibility to co-trimoxazole, thus this drug can be used as an additional drug in the treatment of M/XDR tuberculosis patients. Using co-trimoxazole as an additional drug to isoniazid in the model of generalized tuberculosis in mice infected with *Beijing* strain with XDR reduced the bacterial load of the lungs by 10 times.

Detail evaluation of drug susceptibility/resistance of tuberculous mycobacteria to the additional drug of co-trimoxazole and investigation of the interaction of this drug with other agents included into treatment regimens IV and V can form the basis for improvement of treatment regimens for M/XDR tuberculosis patients with specification of doses and frequency of drug in-takes for each specific case.

Key words: experimental tuberculosis in mice, M/XDR tuberculosis, drug susceptibility of *M. tuberculosis* to co-trimoxazole

Сложность лечения больных туберкулезом при наличии МЛУ/ШЛУ возбудителя во многом обусловлена ограниченным арсеналом эффективных и доступных противотуберкулезных средств. Разработка новых противотуберкулезных препаратов (ПТП) и их внедрение в клиническую практику являются длительными и чрезвычайно дорогими, что заставляет клиницистов обратить внимание на антибактериальные препараты, которые обладают противотуберкулезным потенциалом, например ко-тримоксазол (сульфаметоксазол 0,4 в сочетании с триметопримом 0,08). Добавление ко-тримоксазола в схемы лечения больных туберкулезом с

ВИЧ-инфекцией имело в ряде случаев положительный эффект [11, 15]. Механизм этого эффекта не обсуждался детально, однако Всемирная организация здравоохранения рекомендует ко-тримоксазол для профилактики летальности при ВИЧ-инфекции [7].

Фармакокинетические свойства триметоприма и сульфаметоксазола во многом совпадают. После однократного введения 160 мг триметоприма и 800 мг сульфаметоксазола максимальная концентрация в плазме крови составляет 1,5-3 мкг/мл для триметоприма и 40-80 мкг/мл для сульфаметоксазола. При длительности приема в несколько дней и кратности приема каждые 12 ч концентрации

обоих веществ стабилизируются в вышеуказанных пределах. Периоды полувыведения составляют в среднем 10 ч для триметоприма и 10-16 ч для сульфаметоксазола. Степень связывания с белками плазмы достигает 42-46% для триметоприма и 11% для сульфаметоксазола. Оба вещества, а также их метаболиты выводятся в основном с мочой, причем около 50% триметоприма и 20% сульфаметоксазола – в неизмененном виде. Метаболиты сульфаметоксазола не обладают антибактериальной активностью, в то время как некоторые метаболиты триметоприма фармакологически активны. По данным литературы, концентрация компонентов ко-тримоксазола у человека может достигать следующих значений в сыворотке крови: сульфаметоксазол – 161 ± 59 мкг/мл (при дозировке 2 400 мкг/сут), а триметоприм – $5,8 \pm 2,7$ мкг/мл (при дозировке 480 мкг/сут) [4]. То есть терапевтический антибактериальный эффект ко-тримоксазола можно ожидать при устойчивости микроорганизмов к концентрациям ниже 40 мкг/мл по сульфаметоксазолу при дозировках от 1 000 до 2 400 мг препарата в сутки. Это согласуется с международными рекомендациями EUCAST от 2014 г. по клиническим рекомендациям расчета режимов назначения препаратов с неустановленными значениями критических концентраций [5].

Эмпирическое назначение антибиотиков не всегда завершается эффективной терапией. Это можно объяснить неизвестной исходной чувствительностью возбудителя к ним на фоне отсутствия эпидемиологических данных о распространении лекарственно-устойчивых форм возбудителя. В настоящее время опубликованные результаты исследований чувствительности МБТ к ко-тримоксазолу носят дискуссионный характер. Так, по данным Forgacs P. et al. [6], 43 из 44 культур МБТ, выделенных от пациентов, были чувствительны к комбинации триметоприм : сульфаметоксазол 1 : 19. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) для *M. tuberculosis* была сопоставима с МИК для *M. kansasii*, *M. marinum*. В исследованиях Huang T. S. et al. [8] изучили 117 клинических штаммов МБТ, из которых 28 были чувствительны к ПТП, остальные имели МЛУ/ШЛУ (52 и 36 соответственно). Отмечено, что сульфаметоксазол ингибировал рост 80% колоний МБТ у всех 117 культур независимо от устойчивости к ПТП, проявляя МИК90 от 9,5 мкг/мл. При концентрации препарата 38 мкг/мл наблюдалось ингибирование 99% колоний МБТ. К триметоприму все 117 культур оказались устойчивы в концентрации от 8 мкг/мл и выше. Комбинация триметоприм : сульфаметоксазол в соотношении 1 : 19 не проявляла аддитивного или синергидного действия. Тем не менее авторы считали необходимым продолжать исследования по повышению биодоступности и терапевтической активности сульфаниламидных препаратов для лечения туберкулеза.

Моделирование режимов лечения туберкулеза на мышах является общепризнанной практикой. В большинстве случаев экспериментальные исследования по заражению и лечению туберкулеза у мышей проводят с использованием лабораторного штамма *H37Rv*, однако гораздо больший интерес вызывают лекарственно-устойчивые формы генетического семейства *Beijing*. Как известно, именно это генетическое семейство вызывает наибольшую тревогу у эпидемиологов, расследующих вспышки заболевания туберкулезом, и это генетическое семейство наиболее часто ассоциируется с распространением МБТ с МЛУ [10].

Цель исследования: изучить эффективность применения ко-тримоксазола при лечении мышей, больных туберкулезом, вызванным лекарственно-устойчивыми микобактериями с предполагаемой чувствительностью к ко-тримоксазолу.

Материалы и методы

Микробиологические методы исследования

Образцы клинических культур МБТ получали из легочного диагностического материала (мокрота, бронхоальвеолярные смывы, лаважи т. д.) при первичном росте на традиционных стандартных плотных питательных средах Левенштейна – Йенсена и Финна-2 из микробиологической лаборатории НИИФП (Москва). Всего изучено 78 культур МБТ: 18 выделены из мокроты у впервые выявленных больных, 60 культур выделены из мокроты больных, прошедших несколько курсов противотуберкулезной терапии, включающих препараты 2-го ряда.

С помощью метода абсолютных концентраций [1] определяли лекарственную чувствительность культур МБТ к стрептомицину, изониазиду, рифампицину, этамбутолу, канамицину, амикацину, циклосерину, капреомицину, офлоксацину, этонамину, пара-аминосалициловой кислоте. Определение проводили к критической и максимальной концентрациям препаратов, сопоставимым с максимально переносимой пациентами дозой. Лекарственную чувствительность использованного в эксперименте штамма МБТ оценивали до и после экспериментальных исследований.

Все культуры тестировали с помощью иммунохроматографического теста по видоспецифичному белку МРТ64 – тест SD TB Ag МРТ64 Rapid (Ю. Корея). Чистоту культур проверяли путем посева суспензии с концентрацией 1×10^7 микробных тел (м. т.) на 5%-ный кровяной агар. Концентрацию микробных тел оценивали визуально по стандарту мутности № 5 ГИСК им. Л. А. Тарасевича, содержащего 5×10^8 м. т., а также нефелометром по стандарту мутности МакФарланд 0,5.

В подготовительной работе для оценки МИК тест-культур МБТ использовали классические методики (выращивание на плотных питательных средах, микроскопия) [1] и методики MGIT Bactec –

технологии для оценки МИК [2, 12]. В основе теста на лекарственную чувствительность МБТ в системе MGIT лежит модифицированный метод пропорций. В процессе определения происходит сравнение скорости роста МБТ в контрольной пробирке в разведении микробной суспензии 1 : 100 и в пробирках с лекарственными препаратами. Для оценки МИК к ПТП использовали метод серийных разведений в жидких питательных средах в системе Sensititre (Treck Diagn. System) с использованием микропланшета MYCOTBI.

Подготовка препаратов для определения лекарственной чувствительности

Использовали чистые субстанции (производства Sigma). Активность препаратов рассчитывали согласно молекулярной формуле общего соединения и характеристик, указанных в подтверждающем сертификате веществ. Для приготовления навесок препаратов использовали электронные весы Ohaus (США) с диапазоном взвешивания от 0,1 мг до 60 г, класс точности 2. Для препаратов подбирали условия растворения и стабильности раствора при приготовлении разведений. В качестве компонентов для таких рабочих растворов используется дистиллированная вода, раствор 0,1N едкого натра, питательная среда *Middlebrook 7H9*, чистый этиловый спирт.

Сполиготикирование штаммов МБТ

Сполиготикирование проводили согласно инструкции (руководству) к набору реагентов (Сполиго-Биочип) [3]. Принцип действия набора основан на анализе региона прямых повторов (DR) генома микобактерий туберкулезного комплекса. Гибридизацию на биологическом микрочипе проводят с ПЦР-продуктами с целью установления наличия/отсутствия каждой из 43 последовательностей спейсеров в геноме возбудителя туберкулеза. Биочип включает 43 элемента, каждый из которых содержит уникальный зонд, специфичный к одному из 43 спейсеров региона прямых повторов.

Анализ результатов гибридизации выполняют на универсальном аппаратно-программном комплексе для анализа биочипов (ТУ 9443-004-02699501-2006, регистрационное удостоверение Росздравнадзора № ФСР 2010/08002). Интерпретация результатов гибридизации на биочипе осуществляется программно в автоматическом режиме с выдачей информации о профиле (сполиготипе) штамма микобактерий туберкулезного комплекса в соответствии с международной базой данных SPOLDB4 (www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr).

Определение ассоциированных с лекарственной устойчивостью мутаций в генах МБТ. Для характеристики микроорганизмов проводили выявление мутаций с помощью набора реагентов «ТБ-Тест» в формате биочип-технологий производства «ИМБ-биочип». Исследовали гены, ассоциированные с устойчивостью к изониазиду, рифампицину, этамбутолу, фторхинолонам, амина-

гликазидам. Анализ и интерпретацию результатов реакций проводили на том же оборудовании, что и при сполиготикировании.

Экспериментальные исследования. Экспериментальные исследования проведены на 60 белых беспородных мышах, самках, средней массой 28-30 г. Животных заражали культурой МБТ, выделенной от пациента, которую вводили в венозный синус глаза в объеме 0,1 мл бактериальной взвеси, содержащей 1×10^8 клеток на 1 мл суспензии. После 17 дней от начала заражения давали изониазид и ко-тримоксазол в различных комбинациях. После 30 дней приема препаратов мышей выводили из эксперимента путем дислокации шейных позвонков и в этот же день проводили макроскопическую оценку поражения органов и отбирали материал на микробиологические исследования. При вскрытии исследовали макроскопически внутренние органы, взвешивали легкие, селезенку, печень для вычисления их «весовых» индексов (отношение массы органа к массе тела). В легких оценивали размеры и количество туберкулезных очагов и подсчитывали степень поражения легких по 4-балльной системе. При соблюдении правил асептики забирали материал (кусочки легких) для микробиологических исследований. Резецированные части легких взвешивали, затем гомогенизировали в стерильных ступках. Гомогенат центрифугировали с 3%-ной серной кислотой для исключения контаминации, дважды отмывали физиологическим раствором. Осадок ресуспендировали в питательной среде *Middlebrook 7H9*. Для выявления МБТ использовали классические методики (посев на стандартную плотную питательную среду Левенштейна – Йенсена и люминесцентную микроскопию) и Bactec-технологии [1, 2].

Для лечения использовали изониазид (ОАО «Фармасинтез», Россия) в виде таблеток по 0,15 г и ко-тримоксазол (Бисептол, АО «Польфа», Польша) в виде таблеток 0,48 г.

Выбор культуры МБТ для эксперимента

Для определения лекарственной чувствительности в качестве действующего начала препарата использовали чистые субстанции триметоприм и сульфаметоксазол в соотношении 1 : 19. Оба компонента плохо растворимы в воде. Для определения минимальных ингибирующих концентраций ко-тримоксазола в системе MGIT Bactec-960 были выбраны значения МИК в мкг/мл от 0,125/2,38 до 8/152 (триметоприм/сульфаметоксазол). Соотношения 1 : 19 между компонентами приняты для микробиологических исследований в международной практике [14]. В качестве растворителя оптимальным растворителем оказалась среда *Middlebrook 7H9* с добавками роста (OADC), позволяющими создать концентрацию этих препаратов, необходимую для составления маточного раствора (480 мкг/мл по сульфаметоксазолу). Дизайн создания линейки концентраций препаратов с кратностью разведения,

равной двум, стандартен. Активность субстанций принималась за 0,98.

Для эксперимента был отобран высоковирулентный штамм *Beijing* МБТ № 4661 с ШЛУ со значением МИК по основному действующему началу ко-тримоксазола – сульфаметоксазол, равным 20 мкг/мл, что должно обеспечивать терапевтическое окно у больных с разной фармакокинетикой этого препарата [4].

Профиль штамма по чувствительности к ПТП был следующим (табл. 1):

Профиль лекарственной чувствительности штамма МБТ № 4661 *Beijing* на основе метода абсолютных концентраций приведен в табл. 2.

На генетическом уровне оценка лекарственной чувствительности была проведена на основе изучения мутаций в ключевых генах, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, и выявлены следующие мутации в геноме штамма (табл. 3).

Все результаты показывают, что штамм относится к группе МБТ с ШЛУ, характеризующихся соответствующими мутациями в геноме, и имеет высокую степень устойчивости к основным ПТП (изониазиду, рифампицину), ко всем фторхинолонам и к канамицину с капреомицином. Иными словами, при инфицировании этим штаммом МБТ он может не реагировать на препараты, назначаемые в высокой дозировке, и проявлять устойчивость к четвертому и пятому режимам химиотерапии [13].

Экспериментальное моделирование режимов лечения туберкулеза. Перед началом лечения (через 16 дней после заражения) мышей распределили по группам в соответствии с используемыми препаратами по 10 особей в каждой (табл. 4).

Препараты животным вводили внутривенно с помощью специального зонда однократно в сутки, ежедневно в течение 4 нед. Использовали следующие дозы препаратов: изониазид 25 мг/кг –

Таблица 1. Профиль штамма МБТ № 4661 *Beijing* по чувствительности к противотуберкулезным препаратам на основании определения МИК

Table 1. Profile of TB strain no. 4661 *Beijing* as per sensitivity to anti-tuberculosis drugs based on minimum inhibiting concentrations

Препарат; критические значения концентраций ПТП, мкг/мл	<i>Ofi</i> ; 2,0	<i>Mox</i> ; 2,0	<i>Rif</i> ; 1,0	<i>Am</i> ; 1,0	<i>Str</i> ; 1,0	<i>RB</i> ; 0,5	<i>PAS</i> ; 4,0	<i>Etn</i> ; 5,0	<i>Cs</i> ; 30	<i>H</i> ; 0,2	<i>Kan</i> ; 2,5	<i>E</i> ; 5,0
МИК препарата мкг/мл	> 8	4	32	0,5	64	2	< 0,5	10	8	> 8	10	4
Интерпретация	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>S</i> #	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>S</i>

Примечание: интерпретация [13] *R* – устойчив; *S* – чувствителен; *S*# – промежуточное значение.

Таблица 2. Профиль штамма МБТ № 4661 *Beijing* по устойчивости к противотуберкулезным препаратам на основании метода абсолютных концентраций. Концентрация ПТП в мкг/мл

Table 2. Profile of TB strain no. 4661 *Beijing* as per resistance to anti-tuberculosis drugs based on absolute concentrations technique. Concentrations of TB drugs in mkg/ml

ПТП	<i>S10</i>	<i>S25</i>	<i>H1</i>	<i>H10</i>	<i>R40</i>	<i>R80</i>	<i>E2</i>	<i>E5</i>	<i>Kn30</i>	<i>Kn50</i>	<i>Cs30</i>	<i>Cs50</i>
Результат	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>S</i> #	<i>S</i>	<i>S</i>
ПТП	<i>Cp30</i>	<i>Cp50</i>	<i>Ofi2</i>	<i>Ofi10</i>	<i>Etn30</i>	<i>Etn50</i>	<i>Pas1</i>	<i>Pas5</i>	<i>Am8</i>	<i>Am32</i>		
Результат	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i> #	<i>S</i>		

Примечание: интерпретация [1] *R* – устойчив; *S* – чувствителен; *S*# – промежуточное значение.

Таблица 3. Мутации в геноме штамма № 4661 *Beijing*, ассоциированные с лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам

Table 3. Genomic mutations of strain no. 4661 *Beijing* associated with drug resistance to anti-tuberculosis drugs

Препарат	Изученные гены	Выявленные мутации	Интерпретация
Изониазид	<i>katG</i>	<i>Ser315Thr(1)</i>	<i>R</i>
	<i>inhA</i>	<i>C15T</i>	<i>R</i>
	<i>ahpC</i>	Не выявлено	<i>S</i>
Рифампицин	<i>rpoB</i>	<i>Leu511Arg; His526Leu</i>	<i>R</i>
Этамбутол	<i>embB</i>	<i>Gln497Arg</i>	<i>R</i>
Фторхинолоны	<i>gyrA</i>	<i>Asp94Gly</i>	<i>R</i>
	<i>gyrB</i>	Не выявлено	<i>S</i>
Аминогликозиды и полипептиды	<i>eis</i>	<i>G37T</i>	<i>R</i>

Таблица 4. Характеристика групп животных по режимам назначения химиотерапии

Table 4. Characteristics of mice groups as per prescribed chemotherapy regimens

Группа, №	Препараты, доза (мг/кг)
1	Изониазид, 25
2	Ко-тримоксазол, 250
3	Ко-тримоксазол, 500
4	Изониазид, 25 + ко-тримоксазол, 250
5	Изониазид, 25 + ко-тримоксазол, 500
6	Без препаратов, контроль

средняя терапевтическая доза для химиотерапевтических экспериментов на мышах. Ко-тримоксазол использовали в средней дозе 250 мг/кг, что соответствует приему 1 920 мг человеком, и в 2 раза ее превышающей (500 мг/кг). Указанные дозировки использовали согласно признанным в таких случаях моделям лечения [9]. Несмотря на то что штамм МБТ обладал выраженной лекарственной устойчивостью к изониазиду (МИК более 16 мкг/мл), в опыте использовали сочетание препаратов, полагая, что ко-тримоксазол выступает как аддитивный препарат. С другой стороны, ко-тримоксазол используется как химиопрофилактика против летальности ВИЧ-инфицированных больных, однако его назначение в сочетании с изониазидом как химиопрофилактика от туберкулеза у ВИЧ-инфицированных контингентов еще не изучено детально.

Результаты исследования

Результаты определения МИК ко-тримоксазола в отношении изониазид-чувствительных и изониазид-устойчивых культур МБТ в параллельных (одновременных) исследованиях к другим противотуберкулезным препаратам (изониазиду, в частности) приведены в табл. 5 и 6.

В табл. 6 приведены результаты определения МИК ко-тримоксазола в отношении культур МБТ с МЛУ, при устойчивости МБТ к изониазиду в концентрации 1,0 мкг/мл и более (методом абсолютных концентраций).

Результаты экспериментальных исследований представлены разделами макроскопических и микробиологических исследований. За время эксперимента наблюдалась гибель от прогрессирования туберкулеза на 5-6-й нед. после заражения 3 мышей в контрольной группе и 2 мышей в опытной группе, получавшей ко-тримоксазол в дозе 250 мг/кг. В других группах гибели животных не было. Существенных различий между всеми группами по изменению массы мышей не выявлено. Результаты макроскопических исследований мышей представлены в табл. 7.

Результаты применения разных режимов лечения туберкулеза у мышей по данным микробиологических исследований приведены на рисунке. Пред-

Таблица 5. МИК ко-тримоксазола в отношении изониазид-чувствительных культур МБТ

Table 5. Minimum inhibiting concentration of co-trimoxazole respective isoniazid susceptible cultures of tuberculous mycobacteria

Количество штаммов МБТ	МИК (мкг/мл) изониазида	Чувствительность к изониазиду (метод абсолютных концентраций)	МИК (мкг/мл) триметоприм/сульфаметоксазол
4 8 4 1	0,063	< 1 мкг/мл	1/19 (4 шт.) 2/38 (8 шт.) 4/76 (4 шт.) 8/152
10 4	0,125	< 1 мкг/мл	2/38 (10 шт.) 4/76 (4 шт.)
4 4	0,25	< 1 мкг/мл	2/38 (4 шт.) 4/76 (4 шт.)
2 2	0,5	< 1 мкг/мл	2/38 (2 шт.) 4/76 (2 шт.)

Таблица 6. МИК ко-тримоксазола для культур МБТ, устойчивых к изониазиду в концентрации 1,0 мкг/мл и более

Table 6. Minimum inhibiting concentration of co-trimoxazole for tuberculous mycobacteria cultures resistant to isoniazid in the concentration of 1.0 mkg/ml and more

Количество штаммов МБТ	МИК мкг/мл изониазида	Устойчивость к изониазиду (метод абсолютных концентраций), мкг/мл	МИК (мкг/мл) триметоприм/сульфаметоксазол
1	> 16	> 10	0,5/9,5 (1 шт.)
1 2 6	> 16 16 8	> 10 < 10 < 10	1/19 (9 шт.)
5 12 2 1 1	> 16 16 8 4 2	> 10 < 10 < 10 < 10 < 10	2/38 (21 шт.)
3 3	> 16 16	> 10 < 10	4/76 (6 шт.)
1 1	2 16	< 10 < 10	8/152 (1 шт.) > 8/152 (1 шт.)

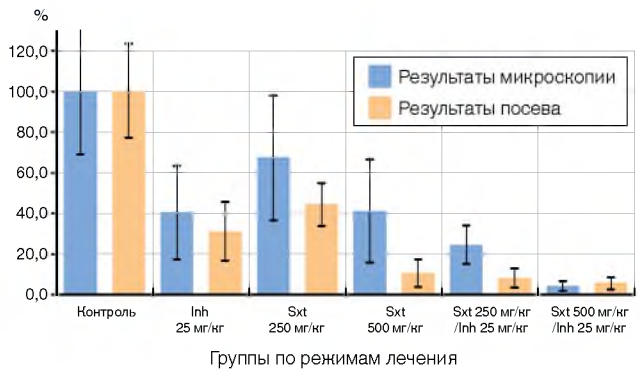


Рис. Бактериальная нагрузка легких (*M. tuberculosis*) в группах мышей. В опытных группах выражена в % от контрольной группы; Inh – изониазид; Sxt – ко-тримоксазол

Fig. Bacterial load of the lungs (*M. tuberculosis*) in mice groups. It is stated as per cent for experimental groups out of the control one. Inh – isoniazid; Sxt – co-trimoxazole

Таблица 7. «Весовые» индексы легких, селезенки, печени и степень поражения легких мышей опытных и контрольной групп

Table 7. «Weight» indices of the lungs, spleen, liver and degree of pulmonary lesions of the mice from experimental and control group

№ группы	Препараты, доза (мг/кг)	Количество мышей	«Весовой» индекс (мг/г)			Степень поражения легких
			легких	селезенки	печени	
1	Изониазид, 25	10	1,11 ± 0,06*	1,00 ± 0,08*	6,07 ± 0,21	3,20 ± 0,13*
2	Ко-тримоксазол, 250	8	1,74 ± 0,31	1,20 ± 0,14	6,64 ± 0,17	3,25 ± 0,31
3	Ко-тримоксазол, 500	10	1,08 ± 0,15*	0,83 ± 0,07*	5,96 ± 0,27	2,40 ± 0,40*
4	Изониазид, 25 + ко-тримоксазол, 250	10	1,10 ± 0,06*	0,96 ± 0,08*	6,47 ± 0,26	2,60 ± 0,27*
5	Изониазид, 25 + ко-тримоксазол, 500	10	0,90 ± 0,11*	1,43 ± 0,17	6,85 ± 0,36	1,45 ± 0,14*
6	Без препаратов, контроль	7	1,93 ± 0,20	1,55 ± 0,19	6,95 ± 0,36	3,86 ± 0,14

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

ставлены сравнительные данные степени поражения легких, полученные методом культивирования МБТ и микроскопии материала легочной ткани.

Как следует из результатов определения МИК препаратов в выборке МБТ, МИК ко-тримоксазола по отношению к изониазид-чувствительным культурам МБТ по компонентам препарата (триметоприм/сульфаметоксазол) в 35% случаев имеет значение 4/76 мкг/мл или более, что является довольно высокой величиной и превышает рассчитанное на основе фармакокинетики препарата критическое значение эффективности препарата. Значение МИК 2/38 мкг/мл, которое проявляется и у референс-штамма МБТ *H37Rv*, имеет пограничное значение и может быть основой неуверенных результатов эффективности режима лечения. Изониазид-устойчивые культуры демонстрируют более широкий спектр восприимчивости к ко-тримоксазолу. МИК ко-тримоксазола в этой группе МБТ варьирует от 0,5/9,5 мкг/мл по компонентам триметоприм/сульфаметоксазол до значений 8/152 мкг/мл и более. Среди этих культур в 25% случаев МИК имеет значение от 0,5/4,75 до 1/19 мкг/мл по компонентам препарата (триметоприм/сульфаметоксазол), что является удовлетворительным значением с точки зрения прогноза воздействия ко-тримоксазола на МБТ при назначении суточных дозировок препарата около 2 000 мг на среднестатистическую массу тела. В 55% случаев МИК ко-тримоксазола имел значение 2/38 мкг/мл, что близко к критическому значению, и расчет режима лечения должен основываться на назначении препарата от 2 000 мг/сут. Оставшиеся 20% культур МБТ проявляют умеренную и высокую устойчивость к ко-тримоксазолу. Другими словами, назначение ко-тримоксазола в качестве аддитивного препарата следует производить при контроле чувствительности к нему штаммов МБТ.

Отказавшись от модели с использованием чувствительного лабораторного штамма, был выбран высоковирулентный штамм с ШЛУ из семейства *Beijing*, чтобы приблизить эксперимент к реальным случаям. Ко-тримоксазол в разных опытных груп-

пах был назначен как основной, так и в качестве «аддитивного», несмотря на то что культура обладала высокой устойчивостью к изониазиду. В какой-то мере это созвучно эмпирическому назначению изониазида ВИЧ-инфицированным больным в качестве химиопрофилактики от туберкулеза в зонах с высоким распространением изониазид-устойчивых штаммов МБТ. Результаты макроскопических исследований мышей показали, что у мышей контрольной группы были наиболее выражены показатели степени поражения легких и «весовые» индексы легких и селезенки. Из опытных групп только у мышей, получавших ко-тримоксазол в дозе 250 мг/кг, не было статистически достоверных различий по этим показателям с контрольной группой. При приеме ко-тримоксазола в дозе 500 мг/кг, а также при комбинации препаратов «весовые» индексы легких и степень их поражения были существенно меньше, чем в контроле. Однако значимых различий в этих показателях между опытными группами, принимавшими оба препарата, не было.

По результатам микробиологических исследований установлено, что ко-тримоксазол вместе с изониазидом давал максимальный эффект угнетения размножения МБТ у животных в дозировке, соответствующей для человека 1 960 мг/сут (в перерасчете на сульфаметоксазол). По сравнению с контрольной группой бактериальная нагрузка у животных снизилась в 10 раз и более по данным посева. По результатам микроскопии этот эффект более выражен. Интересно отметить, что изониазид в качестве основного препарата тоже имел позитивное действие на лечение мышей, хотя значительно менее выраженное, чем при комбинации с ко-тримоксазолом. Подобный эффект уже наблюдался исследователями S. P. Klemens et al. [9], которые изучали воздействие изониазида и других препаратов на мультирезистентный штамм МБТ в эксперименте на мышах. По результатам посева относительный риск снижения бактериальной нагрузки при лечении ко-тримоксазолом в дозе 500 мг/кг по сравнению с изониазидом (25 мг/кг) составляет 3,1, а комбинации

этих препаратов – 6,2. При этом относительный риск снижения бактериальной нагрузки у анализируемой комбинации по сравнению с ко-тримоксазолом в дозе 500 мг/кг составляет 2,0, то есть проявляется эффект суммирования воздействий препарата.

С другой стороны, выраженный синергидный эффект воздействия ко-тримоксазола на МИК изониазида на экспериментальный штамм *in vitro* не обнаружен. Добавление изониазида в питательную среду вплоть до концентрации 8 мкг/мл не смещал границу МИК ко-тримоксазола. Очевидно, что положительное взаимодействие этих двух препаратов *in vivo* требует более детального изучения.

Следует подчеркнуть, что за время эксперимента выделенные от животных культуры МБТ не изменили лекарственно-устойчивый профиль ко всем препаратам, включая изониазид и ко-тримоксазол.

Заключение

При возникновении лекарственной устойчивости МБТ к препаратам 1-го ряда МБТ могут проявлять более широкий полиморфизм по признаку лекар-

ственной восприимчивости к такому препарату, как ко-тримоксазол. Это может служить косвенным объяснением положительного результата лечения больных с МЛУ возбудителя, когда этот препарат назначают в дополнение к стандартным режимам при туберкулезе с МЛУ возбудителя.

Позитивные результаты использования ко-тримоксазола в качестве аддитивного препарата на модели генерализованного туберкулеза у мышей с заражением штаммом возбудителя с ШЛУ, принадлежащим к генетическому семейству *Beijing*, свидетельствуют о перспективности этого направления исследований.

Детальная оценка лекарственной восприимчивости/устойчивости МБТ к аддитивному препарату ко-тримоксазол, а также изучение взаимного влияния этого препарата с набором лекарственных средств, обеспечивающих IV и V режимы лечения, могут служить основой совершенствования режимов лечения больных с МЛУ/ШЛУ возбудителя с уточнением дозировок и кратности приема в каждом конкретном случае.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в РФ / Приказ МЗ РФ от 21.03.2003 г. № 109. – Москва. – 2003. – 169 с.
2. Попов С. А., Пузанов В. А., Rusch-Gerdes S., Siddiqi S. H. Система MGIT для культуральной диагностики и определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза. Стандартные операционные процедуры / BD. – М., 2007. – 24 с.
3. Руководство по применению набора реагентов для сполитотипирования микобактерий туберкулеза человеческого и бычьего типов методом гибридизации на биологическом микрочипе / Регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития РФ № ФСР 2012/13826 от 30.08.2012 г.
4. Ameen S. M., Rolain J. M., Poullain M. N. et al. Serum concentration of co-trimoxazole during a high-dosage regimen // J. Antimicrob. Chemother. – 2014. – Vol. 69. – P. 757-760.
5. EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.4/ EUCAST. – November 2014. – 68 p.
6. Forgacs P., Wengenack N. L., Hall L. et al. Tuberculosis and trimethoprim-sulfamethoxazole // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53. – P. 4789-4793.
7. Guidelines on co-trimoxazole prophylaxis for HIV-related infections among children, adolescents and adults. Recommendations for a public health approach. 7 August 2006/ WHO department of HIV/AIDS. – Geneva, Sw. – 68 p. <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/ctx/en/>
8. Huang T. S., Kunin C. M., Yan B. S. et al. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to sulfamethoxazole, trimethoprim and their combination over a 12 year period in Taiwan // J. Antimicrob. Chemother. – 2012. – Vol. 67. – P. 633-637.
9. Klemens S. P., Destefano M. S., Cynamon M. H. Therapy of multidrug-resistant tuberculosis: lessons from studies with mice // Antimicrob. Agents Chemother. – 1993. – Vol. 37. – № 11. – P. 2344-2347.
10. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful russian clone of *Mycobacterium tuberculosis* // Clin. Microbiol. Rev. – 2013. – Vol. 26, № 2. – P. 342-360.
11. Nunn A. J., Mwaba P., Chintu C. et al. Role of co-trimoxazole prophylaxis in reducing mortality in HIV infected adults being treated for tuberculosis: randomised clinical trial // BMJ. – 2008. – № 337. – P. a257.

REFERENCES

1. Edict no. 109 by On Tuberculosis Control Activities Improvement in the Russian Federation by Russian Ministry of Health as of 21.03.2003 Moscow, 2003, 169 p. (In Russ.)
2. Popov S.A., Puzanov V.A., Rusch-Gerdes S., Siddiqi S. H. *Systema MGIT dlya kultural'noy diagnostiki i opredeleniya lekarstvennoy chuvstvitelnosti mikobakteriy tuberkuleza. Standartnye operatsionnye protsedury*. [MGIT for culture diagnostics and drug susceptibility testing of tuberculosis mycobacteria. Standard operation procedures]. Moscow, 2007, 24 p.
3. *Rukovodstvo po primeneniyu nabora reagentov dlya spoligotipirovaniya mikobakteriy tuberkuleza chelovecheskogo i bychego tipov metodom gibridizatsii na biologicheskom mikrochipe*. [Guidelines on using the set of reagents for spoligotyping of tuberculous mycobacteria of human and bovine species by hybridization technique on the biological microchip]. Registration Certificate no. FSR 2012/13826 as of 30.08.2012 of the RF Federal Health Care and Social Development Surveillance Service.
4. Ameen S.M., Rolain J.M., Poullain M.N. et al. Serum concentration of co-trimoxazole during a high-dosage regimen. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014, vol. 69, pp. 757-760.
5. EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.4. EUCAST. November 2014, 68 p.
6. Forgacs P., Wengenack N.L., Hall L. et al. Tuberculosis and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, vol. 53, pp. 4789-4793.
7. Guidelines on co-trimoxazole prophylaxis for HIV-related infections among children, adolescents and adults. Recommendations for a public health approach. 7 August 2006/ WHO department of HIV/AIDS. Geneva, Sw., 68 p. <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/ctx/en/>
8. Huang T.S., Kunin C.M., Yan B.S. et al. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to sulfamethoxazole, trimethoprim and their combination over a 12 year period in Taiwan. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012, vol. 67, pp. 633-637.
9. Klemens S.P., Destefano M.S., Cynamon M.H. Therapy of multidrug-resistant tuberculosis: lessons from studies with mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993, vol. 37, no. 11, pp. 2344-2347.
10. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful russian clone of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, vol. 26, no. 2, pp. 342-360.
11. Nunn A.J., Mwaba P., Chintu C. et al. Role of co-trimoxazole prophylaxis in reducing mortality in HIV infected adults being treated for tuberculosis: randomised clinical trial. *BMJ*, 2008, no. 337, pp. a257.

12. Rusch-Gerdes S., Pfyffer G. E., Chadwick C. M., Siddiqi S. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Mar. – P. 688-692.
13. WHO Updated interim critical concentration for 1st and 2nd line DST (May 2012)/ http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/Updated%20critical%20concentration%20table_1st%20and%202nd%20line%20drugs.pdf
14. Woods G. L., Brown-Elliot B. A., Conville P. S. et al. M24-A2 Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae and other aerobic Actinomycetes; Approved standard – second edition/ Clinical and laboratory standard institute. USA. – NLCISL. – 2011. – 65 p.
15. Zachariah R., Massaquoi M. Co-trimoxazole prophylaxis for HIV-positive TB patients in developing countries // *Trop. Doct.* – 2006. – Vol. 36, № 2. – P. 79-82.
12. Rusch-Gerdes S., Pfyffer G. E., Chadwick C.M., Siddiqi S. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, Mar, pp. 688-692.
13. WHO Updated interim critical concentration for 1st and 2nd line DST (May 2012)/ http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/Updated%20critical%20concentration%20table_1st%20and%202nd%20line%20drugs.pdf
14. Woods G.L., Brown-Elliot B.A., Conville P.S. et al. M24-A2 Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae and other aerobic Actinomycetes; Approved standard - second edition/ Clinical and laboratory standard institute. USA, NLCISL, 2011, 65 p.
15. Zachariah R., Massaquoi M. Co-trimoxazole prophylaxis for HIV-positive TB patients in developing countries. *Trop. Doct.*, 2006, vol. 36, no. 2, pp. 79-82.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

НИИ фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» МЗ РФ,
127994, Москва, ул. Достоевского, д. 4.

Попов Сергей Александрович

кандидат медицинских наук,
заведующий микробиологической лабораторией.
Тел./факс: 8 (495) 681-84-22, 8 (495) 681-51-23,
8 (495) 681-59-88.
E-mail: popov_s55@mail.ru

Можокина Галина Николаевна

доктор медицинских наук, заведующая отделом
лабораторных методов исследований во фтизиатрии.
Тел.: 8 (495) 681-84-22; 8 (495) 688-41-85.
E-mail: mojokina@mail.ru

Косенков Сергей Александрович

аспирант отдела аспирантуры и докторантуры.
Тел./факс: 8 (495) 681-84-22, 8 (495) 681-51-23,
8 (495) 681-59-88.
E-mail: pechen7@rambler.ru

Елистратова Наталия Александровна

кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник микробиологической лаборатории.
Тел./факс: 8 (495) 681-84-22, 8 (495) 681-51-23,
8 (495) 681-59-88.

Сабгайда Тамара Павловна

доктор медицинских наук, профессор.
E-mail: tamara@mednet.ru

FOR CORRESPONDENCE:

Research Institute of Phthiopulmonology by I.M. Sechenov First
Moscow State Medical University,
4, Dostoevsky St., Moscow, 127994.

Sergey A. Popov

Candidate of Medical Sciences,
Head of Microbiological Laboratory.
Phone/Fax: +7 (495) 681-84-22, +7 (495) 681-51-23,
+7 (495) 681-59-88.
E-mail: popov_s55@mail.ru

Galina N. Mozhokina

Doctor of Medical Sciences, Head of Department for
Laboratory Testing in Phthisiology.
Phone: +7 (495) 681-84-22; +7 (495) 688-41-85.
E-mail: mojokina@mail.ru

Sergey A. Kosenkov

Post Graduate Student of Post-Graduate Training Programs.
Phone/Fax: +7 (495) 681-84-22, +7 (495) 681-51-23,
+7 (495) 681-59-88.
E-mail: pechen7@rambler.ru

Nataliya A. Elistratova

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher
of Microbiological Laboratory.
Phone/Fax: +7 (495) 681-84-22, +7 (495) 681-51-23,
+7 (495) 681-59-88.

Tamara P. Sabgayda

Doctor of Medical Sciences, Professor.
E-mail: tamara@mednet.ru

Поступила 15.09.2016

Submitted as of 15.09.2016